UNTERSUCHUNGEN ÜBER DAS QUANTITATIVE VERHALTEN DES PHENOLS BEI DER EINWIRKUNG AUF BAKTERIEN.

INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DER

MEDIZINISCHEN DOKTORWÜRDE

VORGELEGT DER

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT

DER

ALBERT-LUDWIGS-UNIVERSITÄT

ZU

FREIBURG IM BREISGAU

VON

LEONARD BOJAKOWSKI

AUS

WARSCHAU.

ACAD. LUGD. BAT. BIBL.

DEUTSCHER VERLAG FÜR VOLKSWOHLFAHRT G. M. B. H.
BERLIN W., NOLLENDORFSTR. 29—30.
1912

Gedruckt mit Genehmigung der medizinischen Fakultät zu Freiburg i. Br.

Dekan:
Geh. Hofrat Professor Dr. Axenfeld

Referent:
Geh. Hofrat Prof. Dr. Schottelius
i. V.:
Professor Dr. Küster

Druck von Oscar Brandstetter in Leipzig.

Bei der Prüfung von Desinfektionsmitteln haben bei weitem die meisten Untersucher sich seither mit der rein praktischen Auswertung der Desinfektionskraft nach herkömmlichen Methoden begnügt. Das Wesentliche dieser Methoden bestand in folgendem: relativ kleine Mengen bestimmter Mikroorganismen (24stündige Bouillonkulturen, an Seidenfäden, Glasperlen oder Granaten angetrocknete Sporen usw.) wurden bei konstanter Temperatur der Einwirkung von Desinfektionslösungen bekannter Konzentration ausgesetzt; nach bestimmten Zeiträumen wurden von den der Desinfektionswirkung ausgesetzten Keimen Proben entnommen, das etwa anhaftende Desinfiziens entfernt oder unwirksam gemacht und darauf durch Kulturverfahren festgestellt, ob Abtötung der Keime erfolgt war oder nicht. Durch Vergleich von verschiedenen Desinfektionsmitteln bei gleicher Versuchsanordnung gelangte man so zu einer relativen Wertbestimmung der Desinfektionskraft.

Wenn dieser Art der Untersuchung auch eine Reihe von Mängeln anhaften (z. B. wird die Anzahl der Keime sowie die Änderung der Lösungsverhältnisse bei Prüfung chemisch-physikalisch differenter Desinfizientien nicht berücksichtigt), so genügt sie doch für praktische Verhältnisse und ist etwa der empirischen Prüfung von Heilmitteln gleichzusetzen. Über die spezielle Art der Wirkung eines Desinfiziens gibt uns eine derartige Untersuchung jedoch keinen Aufschluß, sie zeigt uns auch keine Beziehungen zwischen chemisch-physikalischem Aufbau der Desinfektionslösung und dem Organismus des Bakteriums und setzt uns daher nicht in den Stand auf Grund wissenschaftlicher Erfahrungen analog dem Vorgehen der experimentellen Therapie spezifische höchst wirksame Desinfektionsmittel aufzubauen und die günstigsten Bedingungen für ihre Anwendung herauszufinden.

Autoren, welche in ihren Studien die Art der Keimabtötung durch Desinfizientien zu erklären, das Wesen der Desinfektion zu er-

gründen suchten, teilen gewöhnlich die keimtötenden Sustanzen in zwei Hauptgruppen ein: die Desinfektionsmittel der anorganischen Reihe und die Desinfektionsmittel der aromatischen Gruppe.

Untersuchungen über die Wirkungsweise anorganischer Desinfektionsmittel boten praktisch geringere Schwierigkeiten als bei aromatischen Körpern. Es handelte sich bei ihnen immer um Substanzen mit starken chemischen Affinitäten: z. B. Säuren, Basen, Halogenen, Metallsalzen, die das Leben der Mikroorganismen vernichten, indem sie mit lebenswichtigen Zellbestandteilen feste chemische Verbindungen eingehen: das Sublimat bildet mit dem Bakterieneiweiß Quecksilberalbuminat, die Säuren zersetzen die Salze schwächerer Säuren, die im Bakterienleib vorhanden sind und bilden mit dem Eiweiß der Bakterien Säurealbuminat usw.

Die bahnbrechenden Untersuchungen von Krönig und Paul „über die chemischen Grundlagen der Lehre von der Desinfektion" geben uns bezüglich der Wirkungsweise anorganischer Desinfektionsmittel bereits sehr wichtige Aufschlüsse. Sie werden von den Autoren in folgenden Sätzen zusammengefaßt:

„Die Desinfektionswirkung der Metallsalzlösungen hängt nicht allein von der Konzentration des in der Lösung befindlichen Metallsalzes ab, sondern ist gleichzeitig abhängig von den spezifischen Eigenschaften der Salze und der Lösungsmittel.

Die Halogenverbindungen des Quecksilbers wirken nach Maßgabe ihres Dissoziationsgrades.

Die anorganischen Säuren und Basen (Kalium-, Natrium-, Lithium-, Ammoniumhydroxyd) desinfizieren im allgemeinen im Verhältnis ihres elektrolytischen Dissoziationsgrades.

Die Desinfektionswirkung der Halogene Chlor, Brom, Jod nimmt entsprechend ihrem sonstigen chemischen Verhalten mit steigendem Atomgewicht ab[1])."

Von der Wirkungsweise der Desinfektionsmittel aus der aromatischen Reihe haben wir bisher nur geringe Kenntnisse. Der Grund dafür ist wohl darin zu suchen, daß die hierher gehörigen Substanzen, das Phenol, die Kresole usw., keine stark hervortretenden chemischen Affinitäten besitzen und daher keine festen Verbindungen mit Teilen

[1]) Der Vollständigkeit halber sei hier erwähnt, daß die desinfizierende Wirkungsart der sogenannten adstringierenden Mittel schon längst geklärt ist. Diese Metallionen, Zink, Kupfer usw. sind Protoplasmagifte und imstande, mit Eiweiß unlösliche Verbindungen: Metallalbuminate zu bilden.

des Bakterienleibes eingehen. Das Molekül dieser Desinfektionsmittel besitzt eine sehr feste Struktur und bleibt erhalten, auch wenn eine kräftige Desinfektionswirkung durch dasselbe entfaltet wird, während die Desinfizientien der anorganischen Reihe bei der Einwirkung auf Bakterien sich zersetzen und neue Verbindungen bilden. Auf diesem Umstand beruht offenbar die große Überlegenheit der aromatischen Desinfizientien über die anorganischen in praktischen Fällen. Da sie mit dem Bakterienprotoplasma und ebenso mit dem etwa gelöst vorhandenen Eiweiß keine feste Verbindung eingehen, ja sogar, wie unsere Untersuchungen für das Phenol zeigen werden, nach Ablauf der Desinfektion unverändert wieder frei werden können, so ist damit eine große Tiefen- und Dauerwirkung ermöglicht, wohingegen das sonst hochwirksame Sublimat mit dem Eiweiß des Bakteriums und der Lösung zu festem Quecksilberalbuminat zusammentritt, als solches ausfällt und vollständig unwirksam wird.

Für das Studium der Theorie der Desinfektionswirkung von aromatischen Substanzen kommt das Phenol in erster Linie in Betracht, weil dasselbe bei starker Desinfektionswirkung ein chemisch gut bekannter Körper ist, der nach verschiedenen Methoden quantitativ und qualitativ, kolorimetrisch, gewichts- und maßanalytisch genau bestimmt werden kann.

Die wichtigsten bisherigen Arbeiten über die Wirkungsweise des Phenols bei der Desinfektion waren kurz folgende:

Im Jahre 1881 stellte Robert Koch[1]) fest, daß in öligen und alkoholischen Lösungen die Wirksamkeit des Phenols fast vollständig verloren geht. Dieser Befund wurde von Knorre und Wolffhügel[2]) zum Ausgangspunkt weiterer Studien genommen. Sie fanden, daß Phenol sich in Öl und Alkohol weit besser löst als in Wasser, doch kann nach ihrer Ansicht das ermittelte Teilungsverhältnis keinen befriedigenden Aufschluß über die Ursache der Unwirksamkeit des Karbolöls geben, solange nicht nachgewiesen ist, daß dasselbe auch für den Übergang der Karbolsäure in die Mikroorganismen ebenfalls Geltung hat.

Im Jahre 1896 glaubte Scheurlen[3]) in einer Untersuchung über „die Bedeutung des Molekularzustandes der wassergelösten Desinfek-

---

[1]) Robert Koch, „Über Desinfektion", Mitteil. a. d. Kaiserlich. Gesundheitsamte 1881, Bd. 1, S. 234.

[2]) Wolffhügel und Knorre, „Zu der verschiedenen Wirksamkeit von Karbolöl und Karbolwasser", ebenda.

[3]) Arch. f. experimentelle Pathol. und Pharmak. 1896, Bd. 37, S. 74.

tionsmittel für ihren Wirkungswert“ sich dahin entscheiden zu müssen, daß bei Salzgegenwart die Hydratbildung des Phenols in wässerigen Lösungen vermindert und deswegen die Konzentration des Phenols praktisch verstärkt werde. Da nun stärkere Konzentrationen des Phenols eine relativ geringere Hydratbildung aufweisen und biologisch stärker wirken, da ferner bei anorganischen Salzen durch weiteren Salzzusatz in wässerigen Lösungen die Hydratisierung vermindert wird, nimmt er das gleiche auch für den Salzzusatz zu wässerigen Phenollösungen an. Einen Beweis für die Richtigkeit seiner Anschauung sieht er darin, daß eine $1\,^0/_0$ige wässerige Phenollösung durch Zusatz von so viel Kochsalz, als ohne Trübung möglich ist, auf die biologische Wirksamkeit einer konzentrierten wässerigen Phenollösung gebracht wird.

Diese Theorie läßt der Autor in einer weiteren Veröffentlichung (1897 [mit Spiro[1]) zusammen]), „über die gesetzmäßigen Beziehungen zwischen Lösungszustand und Wirkungswert der Desinfektionsmittel“ wieder fallen. Sie fanden, daß die Desinfektionskraft des reinen Phenols in wässeriger Lösung weit stärker ist als die seines Natriumsalzes. Da nun die Dissoziation von Salzen stärker ist als die der zugehörigen Säuren, so führen sie die Wirkung des Phenols auf das nicht dissoziierte Phenolmolekül zurück. Eine Stütze für die Richtigkeit dieser Erklärung erkennen sie darin, daß durch Kochsalzzusatz die Dissoziation des Phenols verringert und gleichzeitig sein biologischer Desinfektionswert erhöht wird.

Im Jahre 1898 glaubten Spiro und Bruns[2]) die erhöhte Wirkung von Phenolsalzlösungen auf Milzbrandsporen dadurch klären zu können, daß sie zunächst die Einzelwirkung des anorganischen Salzes in wässerigen Lösungen für sich feststellten. Nach Römers Theorie sollte die desinfektionssteigernde Wirkung des Kochsalzes mit der vermehrten Eiweißfällung zusammenhängen (da z. B. das stark eiweißfällende Ammoniumsulfat die Desinfektionskraft des Brenzkatechins wesentlich erhöht). Spiro und Bruns können sich dieser Theorie nicht anschließen, da einmal 6 Tage mit Kochsalzlösung behandelte Bakterien gegen Phenol nicht empfindlicher sind als unbehandelte, da weiterhin der Desinfektionswert des Sublimates durch Kochsalz-

[1]) Scheurlen und Spiro, „Die gesetzmäßigen Beziehungen zwischen Lösungszustand und Wirkungswert der Desinfektionsmittel“, Münchn. med. Wochenschrift 1897, Bd. 44, S. 4.

[2]) Spiro und Bruns, „Zur Theorie der Desinfektion“, Archiv f. experim. Pathol. und Pharmakologie 1898, Bd. 41, S. 355.

zusatz nicht erhöht wird und endlich Stoffe, die Eiweiß gut ausfällen und gleichzeitig gute Phenollösungsmittel sind, die biologische Kraft des Phenols in wässeriger Lösung herabsetzen. Spiro und Bruns ermittelten mit Hilfe von Kulturverfahren, daß die verstärkende Wirkung eines Salzes für wässerige Phenollösung ungefähr dem Aussalzungsvermögen parallel geht. Entsprechend bedingen auch Salze, die Phenol nicht aussalzen, keine Erhöhung der Phenolwirkung.

Äquimolekulare Salzmengen mit gleicher Dissoziationskonstante z. B. von NaCl und JNa bringen eine ungleiche Erhöhung des Desinfektionswertes einer wässerigen Phenollösung zuwege (NaCl wirkt erheblich stärker) und daher ist ihre Wirkung unabhängig von der Größe der Ionisation. Sie fanden auch, daß der Grad der Löslichkeit eines Salzes, welche von der Kapazität der Lösung abhängig ist, für die Verstärkung des Desinfektionswertes, welche dasselbe hervorbringt, nicht entscheidend ist. Auf Grund aller dieser Erhebungen gelangen sie zu der Schlußfolgerung, daß es sich bei der Verstärkung einer wässerigen Phenollösung durch Salzzusatz um einen ganz eigentümlichen Vorgang „einen Intensitätsvorgang" handelt, der mit den Kapazitätserscheinungen, die bei der Lösung beobachtet werden, nichts zu tun hat.

Als weitere Entwicklung in der Begründung dieser Lösungstheorie ist die Arbeit von Reichel[1]) zu betrachten. Er untersuchte zunächst das chemisch-physikalische Verhalten des Phenols zwischen zwei Phasen, und zwar I. zwischen öliger Phase und wässeriger Phase und II. zwischen Eiweißphase und wässeriger Phase. Hierbei konnte er feststellen, daß unter diesen Umständen für das Verhalten des Phenols rein chemisch-physikalische Lösungsverhältnisse maßgebend sind, die nach einer gewissen Zeit zu einem Gleichgewichtszustand zwischen den beiden Phasen führen. Der Gehalt jeder Phase an Phenol ist durch den entsprechenden Teilungskoeffizienten bestimmt und dieser Teilungskoeffizient wird durch Zusatz von Kochsalz zugunsten der öligen bzw. der Eiweiß-Phase gegenüber der wässerigen Phase verschoben.

Anhangsweise hat Reichel auch ähnliche Untersuchungen in der Weise durchgeführt, daß er wässerige Aufschwemmungen von Bakterienmassenkulturen als eiweißreiche Phase in Anwendung brachte. Auch hierbei fand er, daß für die Verteilung des Phenols echte

---

[1]) Reichel, „Zur Theorie der Desinfektion", Bioch. Zeitschrift 1909, Bd. 22, S. 149.

Lösungsverhältnisse maßgebend sind und daß der Gleichgewichtszustand durch Kochsalz in typischer Weise, d. h. zugunsten der eiweißreichen Phase, d. i. der Bakteriensubstanz, verändert wird. Auch bei verschiedenen Konzentrationen des Phenols konnte er durch entsprechende Änderung des Kochsalzzusatzes den gleichen Gehalt der Eiweißphase an Phenol erzielen. Die für eine bestimmte Phenolkonzentration hierbei nötige Menge Kochsalz ergibt sich nach chemisch-physikalischen Gesetzen und wurde von ihm für etwa 1 %ige wässerige Phenollösungen berechnet.

Von dem Gedanken ausgehend, daß diese Gesetzmäßigkeit sowohl für nichtorganisiertes wie für organisiertes Eiweiß als Eiweißphase Geltung habe, untersuchte er dann, ob Konzentrationsgemische von wässerigem Phenol und Kochsalz, welche nach der Berechnung einen gleichen inneren Phenolgehalt der Eiweißphase bedingen mußten, auch im biologischen Experiment eine gleiche Desinfektionskraft für Bakterien entwickelten. Es ergab sich, daß diese Annahme annähernd richtig war, nur wirkten die salzhaltigen Lösungen des Phenols auf Bakterien stärker als gesetzmäßig zu erwarten war.

Die folgenden eigenen Untersuchungen erstrecken sich auf das quantitative Verhalten des Phenols bei der Einwirkung auf Bakterien und sind als Fortsetzung von Versuchen zu betrachten, die schon vor drei Jahren auf dem Gr. Bad, Untersuchungsamt für ansteckende Krankheiten, in Freiburg i. Br. begonnen wurden. In den ersten bisher nicht veröffentlichten Untersuchungen hatten Küster und Autenrieth zunächst allgemein festgestellt, daß bei der Einwirkung des Phenols auf Bakterien jeweils eine gewisse Menge des Phenols verschwindet. Sie brachten in Nährbouillon und in physiologischer Kochsalzlösung eine 1 %ige Phenollösung mit einer großen Menge Kolibazillen zusammen, ließen die Mischung 24 Stunden bei Zimmertemperatur stehen, entfernten die Bakterien wieder durch kräftiges Zentrifugieren und bestimmten durch Titration den Phenolgehalt der überstehenden ziemlich bakterienfreien Flüssigkeit. Es ergab sich, daß die Phenolkonzentration deutlich zurückgegangen war. Variierten sie den Versuch derartig, daß sie zur gleichen Menge gleichprozentiger Phenollösung die doppelte Menge Bakterien gaben und wie oben weiter untersuchten, so war der durch Titration bestimmte Verlust an Phenol zwar größer, aber nicht entsprechend dem Gesetz der Multipla doppelt so groß, sondern erheblich geringer.

Wir suchten dann diese Frage des Phenolverbrauches bei der Desinfektionswirkung auf biologischem Wege weiterzuführen, in-

dem wir (cf. Mayer, Inaug.-Diss. Freiburg 1910) die keimtötende Kraft des Phenols mit Hilfe abgemessener Bakterienaufschwemmung quantitativ auszuwerten suchten. Die bis dahin veröffentlichten Versuche zur Prüfung der keimtötenden Kraft von Phenol berücksichtigten nur die Konzentration der Desinfektionslösung, die Dauer der Einwirkung und die Art der zum Verbrauch verwandten Mikroorganismen; die absolute Menge des Desinfiziens und ebenso die absolute Anzahl der abzutötenden Bakterien blieb außer acht. Es lag der Gedanke nahe, daß eine bestimmte Bakterienzahl eine bestimmte Menge des Desinfektionsmittels zur Abtötung benötigt und daß bei einem Desinfektionsversuch Keimfreiheit nur dann eintritt, wenn das Desinfiziens absolut genommen im Überschuß vorhanden ist; bei gleicher Bakterienzahl, aber bei quantitativ verschiedener Abstufung der Desinfektionslösung mußte demnach eine Grenze der Wirksamkeit, d. h. der Keimtötung festzustellen sein. Die Voraussetzung ist dabei, daß jedes Einzelbakterium eine bestimmte Menge des Desinfektionsmittels zu seiner Tötung nötig hat, resp. daß jeder Bakterienkörper eine bestimmte Menge Desinfiziens an sein Protoplasma zu verankern vermag und daß man die Desinfektionslösung im Versuch so lange einwirkan läßt, bis die Reaktion vollständig abgelaufen ist, d. h. alle Keime abgetötet sind.

Zu gleichen Teilen einer dichten Kolisuspension wurden fallende Mengen wässeriger Phenollösung zugesetzt. Dabei kamen drei verschiedene Konzentrationen des Desinfiziens zur Anwendung: eine 10 %ige (natürlich Emulsion, die vor jeder Benutzung kräftig durchgeschüttelt wurde), eine 1 %ige und eine 0,1 %ige Phenollösung. Für jede Konzentration stellten wir 10 Versuche in sterilen Reagenzröhrchen an. In das 1. Röhrchen jeder Reihe wurde 1,0 ccm, in das 2. 0,9, in das 3. 0,8 und so fort, in das letzte 0,1 der Lösung gegeben. Alle Röhrchen wurden darauf mit physiologischer, steriler Kochsalzlösung auf 3 ccm aufgefüllt. Dazu gaben wir von der Koliaufschwemmung in jedes Röhrchen 2 ccm und ferner noch 5 ccm alkalische Nährbouillon, so daß also in jedem der 30 Röhrchen 10 ccm Gesamtinhalt war. Die Röhrchen stellten wir 24 Stunden in den Brutschrank bei 37°. Nach Ablauf dieser Zeit gaben wir von jedem Röhrchen 1 ccm in ein Reagenzglas, das 9 ccm sterile Bouillon enthielt, mischten gut durch und gossen nochmals 1 ccm in ein zweites Röhrchen mit 9 ccm Bouillon. So erhielten wir eine Doppelreihe von 60 beimpften Bouillonröhrchen, die nun zeigen sollten, ob in der Versuchszeit das Phenol die Kolibazillen abgetötet hatte oder nicht. Zu diesem Zwecke kamen die Röhrchen

wieder 24 Stunden in den Brutschrank, dann wurde das Wachstum kontrolliert und dadurch die Grenze der eingetretenen Abtötung festgestellt. In den beimpften Röhrchen waren nur noch solche Verdünnungen des Phenols vorhanden, daß eine Hemmung durch das Desinfektionsmittel ausgeschlossen war. Die Verdünnung gestaltete sich z. B. für das 1. Röhrchen, das 1 ccm der $10^0/_0$igen Phenollösung enthielt, folgendermaßen:

Das Röhrchen erhielt die absolute Menge von 0,1 ccm Phenol, dementsprechend pro Kubikzentimenter 0,01 Phenol; das dazu gehörige 1. Impfröhrchen erhielt also 0,01 Phenol und eine Verdünnung von 1:10000, das zweite Impfröhrchen entsprechend eine Verdünnung von 1:100000. Wie schon unsere ersten Versuche ergaben, liegt die Verdünnung 1:10000 außerhalb der Hemmungswirkung des Phenols und es wurden deswegen in späteren Versuchen nur noch einfache Impfreihen für nötig befunden.

Die Gesamtheit derartig durchgeführter Versuche ergab, daß allerdings Beziehungen zwischen der absoluten Menge des Phenols und der Anzahl der abzutötenden Bakterien bestehen, daß aber eine Gesetzmäßigkeit mit dieser einfachen Versuchsanordnung offenbar nicht festgelegt werden kann.

Inzwischen war (in der Biochem. Zeitschrift) 1909 die oben erwähnte Studie von Reichel über die Wirkung des Phenols erschienen, in der R. auf quantitativ chemischem Wege die Verminderung der Konzentration einer Phenollösung durch die Einwirkung von Bakterien feststellte. Er brachte bei seinen Versuchen größere Mengen von Bakterien in eine bestimmte Phenollösung, entfernte nach einiger Zeit die Bakterien wieder durch Zentrifugieren und titrierte die restierende Phenollösung aus. Er fand, daß salzfreie wässerige Aufschwemmungen von Bakterien sich durch Zentrifugieren nicht vollkommen klären ließen. Die in Suspension verbleibenden Bakterien störten (durch Brom-Bindung) die Titration und machten umständliche Berechnungen notwendig.

Um diese Erschwerung der Versuche auszuschalten und mit reiner wässeriger Phenollösung, wie im biologischen Versuch arbeiten zu können, ersetzten wir (Küster-Bojakowski) das Zentrifugieren durch die Asbestfiltration. Das Asbestfilter war in praktischer Form zuerst von Heim (Schwenzer: Inaug.-Diss. Erlangen 1906) in die bakteriologische Technik eingeführt worden. Für unsere speziellen Zwecke mußten wir dasselbe insofern modifizieren, als wir die gereinigte Asbestwolle als Filtermasse direkt auf einer Nutsche in Anwendung brachten.

Es galt zunächst, die Einwirkung einer Asbestfiltration auf Phenollösungen festzustellen, d. h. aufzuklären, ob eine Phenollösung bei dem Passieren durch Asbest verändert wird, und wenn ja, ob in gesetzmäßiger Weise. Unsere dahingehenden Versuche ergaben, daß die Konzentration einer wässerigen Phenollösung bei dem Zusammenbringen mit Asbestwolle immer vermindert wird und zwar innerhalb bestimmter Grenzen ungefähr proportional der Konzentration der angewandten Phenollösung. Wir brachten 50 ccm von Phenollösungen verschiedener Konzentration in Bechergläsern mit je 10 g Asbestwolle zusammen. Diese Mischung blieb 5 Minuten bei Zimmertemperatur stehen. Darauf wurden nach kräftigem Durchrühren 5 ccm der Lösung abpipettiert und durch Titration der Phenolgehalt bestimmt: z. B.

	I. Versuch		II. Versuch	
Der durch Titration bestimmte Gehalt einer wässerigen Phenollösung betrug vor Einbringung der 10 g Asbestwolle	0,527 %	0,527 %	1,201 %	1,201 %
Nach 5 Minuten langer Einwirkung des Asbestes	0,518 %	0,520 %	1,185 %	1,188 %
Unterschied	0,009	0,007	0,016	0,013

Die Tabelle zeigt, daß von 50 ccm einer etwa 0,5 %igen Phenollösung durch 10 g Asbest 0,068 mg und unter gleichen Umständen von einer 1,2 %igen Phenollösung 0,005 absorbiert werden.

Wir fanden ferner, daß die Verminderung des Phenolgehaltes einer wässerigen Lösung durch Asbest auch der Menge des verwandten Asbestes ungefähr proportional eintritt. Wir brachten zu gleicher Kubikzentimeterzahl einer wässerigen Phenollösung verschiedene Mengen Asbest (5 und 10 g) und behandelten wie oben: z. B.

	I. Versuch		II. Versuch	
Anfängliche Konzentration der wässerigen Phenollösung . . .	1,120 %	1,120 %	1,120 %	1,120 %
Konzentration nach Einwirkung des Asbestes	1,106 %	1,108 %	1,115 %	1,116 %
Unterschied	0,014	0,012	0,005	0,004

Auf Grund der gefundenen Zahlen konnten wir einen annähernd genauen Teilungkoeffizienten für Phenol zwischen Wasser und Asbest mit 100:12 aufstellen, d. h. das Phenol löst sich in Wasser achtmal besser als wie in Asbest.

Die praktische Wirkung eines Asbestfilters auf eine passierende Phenollösung besteht darin, daß der Asbest einmal eine gewisse Menge des Phenols (abhängig von der absoluten Menge des Asbestes und der Konzentration der Phenollösung) an seine Fasern adsorbiert und weiterhin eine gewisse Menge der Phenollösung in seinen Poren festhält. Die in den Poren zurückgehaltene Phenollösung und ebenso das Filtrat ist geringer konzentriert als die Ausgangslösung, welche zur Filtration verwandt wurde, und zwar um die Differenz, welche das im Asbest adsorbierte Phenol an der gesamten filtrierten Lösung hervorbringt. Je größer die Menge der filtrierten Phenollösung von einer bestimmten Konzentration ist, um so geringer ist die Verminderung, welche in der Konzentration des Filtrates (und in der zurückbleibenden Porenflüssigkeit des Asbestes) durch die Absorption des Asbestfilters hervorgerufen wird, desto größer ist aber auch die Wahrscheinlichkeit, ein für eine bestimmte Phenolkonzentration indifferentes Asbestfilter zu gewinnen: Wir brachten 10 g Asbestwolle auf eine Nutsche mit 25 ccm wässeriger Phenollösung zusammen, ließen 5 Minuten stehen und saugten dann die Phenollösung ab. Durch denselben Asbestfilter ließen wir eine 2. Portion von 25 ccm gleichkonzentrierter Phenollösung durchfiltrieren und bestimmten den Phenolgehalt des Filtrates. Diesen fanden wir stets noch beträchtlich vermindert. Wenn wir aber jetzt eine 3. Portion von 25 ccm der gleich konzentrierten Phenollösung durchfließen ließen, so zeigte nunmehr der Phenolgehalt des Filtrates gegenüber der ursprünglichen Konzentration kaum mehr einen Unterschied auf. Es wurden fünf Parallelversuche angestellt.

Konzentration der 3. Portion der Phenollösung vor dem Filtrieren	1,859 %	1,859 %	1,173 %	1,173 %	1,173 %
Phenolgehalt nach der Filtration	1,856 %	1,857 %	1,171 %	1,172 %	1,171 %
Unterschied	0,003	0,002	0,002	0,001	0,002

Auf Grund dieser Ergebnisse haben wir unsere Asbestfilter jeweils in folgender Weise vorbereitet: Wir brachten 5 g Asbest trocken auf eine Nutsche, rührten mit 30 ccm derjenigen Phenolkonzentration, welche für die Bakterien in Anwendung kommen sollte, an, ließen 5 Minuten stehen, filtrierten ab, spülten mit einer 2. Portion von 25 ccm der gleichen Lösung nach und saugten endlich eine dritte Portion von 25 ccm durch, bis daß Schaum aus der unteren Nutschenöffnung hervortrat. Dieses Auftreten von Schaum diente

als Zeichen dafür, daß die in den Poren zurückgebliebene Menge von Phenollösung bei allen Versuchen ungefähr die gleiche war. Folgender Versuch diente uns als Beweis für die Richtigkeit dieser Behauptung: zwei trockene Nutschen wurden im Parallelversuch mit je 5 g Asbest beschickt und wie oben in indifferente Filter verwandelt.

	Ia	IIa	Ib	IIb
Gewicht der Nutsche mit indifferentem Filter	137,2	148,1	136,9	148,3
Gewicht der Nutsche mit 5 g Asbest, trocken	132,1	143,3	132,1	143,3
Menge der zurückgebliebenen Phenollösung	5,1	4,8	4,7	5,0

Der Unterschied von 0,3 ccm zwischen den Flüssigkeitsmengen, die bei einem Parallelversuch auf dem Filter zurückblieben, ist praktisch fast ohne Einfluß, wie folgende Rechnung zeigt: nehmen wir an, wir hätten Filter Ia und IIa für eine $2\,\%$ige Phenollösung indifferent eingestellt und ließen 25 ccm einer $1{,}9\,\%$igen Phenollösung durchfließen, so erhalten wir bei Ia nach der Filtration ein Phenolgehalt von $1{,}916\,\%$, statt $1{,}900\,\%$ und bei IIa erhalten wir $1{,}915\,\%$, statt $1{,}900\,\%$.

Berechnung:

5,1 ccm zu $2\,\%$ enthalten 0,102 g Phenol
25,0 „ „ $1{,}9\,\%$ „ 0,475 g „
30,1 ccm zu $x\,\%$ enthalten 0,577 g Phenol

$$x = \frac{0{,}577 \cdot 100}{30{,}1} = 1{,}916\,\%.$$

4,8 ccm zu $2\,\%$ enthalten 0,096 g Phenol
25,0 „ „ $1{,}9\,\%$ „ 0,475 g „
29,8 ccm zu $x\,\%$ enthalten 0,571 g Phenol

$$x = \frac{0{,}571 \cdot 100}{29{,}8} = 1{,}915\,\%.$$

Einige Versuche bestätigen die Richtigkeit unserer Berechnung. Wir stellten eine Reihe von Asbestfiltern für eine wässerige Phenolkonzentration von $2{,}009\,\%$ indifferent ein und filtrierten nacheinander zwei Portionen von je 25 ccm einer schwächer konzentrierten Phenollösung:

Filter mit 10 g Asbest indifferent für 2,009%.

Portionen	I. 25 ccm	II. 25 ccm	I. 25 ccm	II. 25 ccm
Phenolgehalt vor der Filtration	1,930%		1,930%	
Phenolgehalt nach der Filtration	1,951%	1,934%	1,949%	1,933%
Unterschied	+0,021	+0,004	+0,019	+0,003

Portionen	I. 25 ccm	II. 25 ccm	I. 25 ccm	II. 25 ccm
Phenolgehalt vor der Filtration	1,072%		1,072%	
Phenolgehalt nach der Filtration	1,085%	1,074%	1,089%	1,075%
Unterschied	+0,015	+0,002	+0,017	+0,003

Das Filtrat zeigt also jeweils eine Verstärkung der Konzentration, die bei der ersten Portion noch Zentigramme ausmacht, während bei der zweiten Portion nur noch Milligramme gefunden werden, eine Menge, die für unsere Versuche als Fehlerquelle nicht in Betracht kommt. Aus dem gleichen Grunde haben wir die Phenolmenge, welche in der Asbestfaser absorbiert ist, vollständig vernachlässigt. Eine genaue quantitative Bestimmung des wässerigen Phenols, welches in den Poren des Filters zurückgehalten wurde (etwa 5 ccm), fand nicht statt: nach unserer Versuchsanordnung mußte dieselbe die Konzentrationsverminderung, welche durch die Einwirkung der Bakterien herbeigeführt werden sollte, verkleinern, d. h. in einem für unsere Versuche ungünstigen Sinne zur Geltung kommen, und wenn dadurch der ganze Phenolverlust ausgeglichen worden wäre, so wäre auch die gesamte Versuchsanordnung für unsere Zwecke unbrauchbar gewesen. Alle in unseren Versuchen gefundenen Zahlen für Phenolverminderung durch die einwirkenden Bakterien entsprechen also nicht vollständig der wirklichen Abnahme, sondern sind immer etwas kleiner.

Das Asbestfilter ist demnach für quantitatives Arbeiten mit wässeriger Phenollösung sehr wohl brauchbar; es bietet zudem den großen Vorteil, daß es jederzeit leicht herzustellen ist und lege artis ausgeführt alle Keime zurückhält. Auf diese Keimdichtigkeit des Asbestfilters machte bereits Paul Schrenzer (Inaug.-Diss. Erlangen 1906) aufmerksam, wir selbst konnten uns stets von der Richtigkeit dieser Behauptung überzeugen.

Die titrimetische Bestimmung des Phenols wurde nach Koppeschar ausgeführt. Bei dieser Methode ist eine Fehlerquelle nach

unserem Dafürhalten darin gegeben, daß der Zusatz von Jodkalilösung in den üblichen Glasstöpselflaschen nicht ohne Verlust von Bromdämpfen möglich ist. Dieses Entweichen von Brom muß die genaue Auswertung des Phenols stören und wir benutzten daher in unseren Versuchen Glasstöpselflaschen, die mit einem seitlichen Einfülltrichter versehen waren, welchen ein Glashahn von dem Flascheninnern abschließt. Die Genauigkeit der Phenolbestimmung nach Koppeschar wird gewöhnlich auf 1:20000 angegeben. Da trotz aller Vorsicht bei unseren Versuchen kleine Ungenauigkeiten nicht vermieden werden können, so führen wir nur Schwankungen des Phenolgehaltes in den Zentigrammen auf die Einwirkung der Bakterien zurück.

Die Bakterienmassen, welche wir bei unseren Desinfektionsversuchen in Anwendung brachten, wurden mit Wasser von der Oberfläche der Glyzerinagarplatten abgeschwemmt. Hierbei ließ es sich natürlich nicht vermeiden, daß außer den Bakterien auch kleine Mengen des Nährbodens und ebenso Bakterien-Stoffwechselprodukte mit in die Abschwemmung gelangten. Diese Beimengungen hätten vielleicht durch Waschen der Bakterien verringert werden können. Wir sahen von diesem Vorgehen als zu umständlich ab und konnten durch Vorversuche beweisen, daß jene Beimengungen auf den Ausfall des Versuches keinen Einfluß hatten. Wenn wir nämlich aus der wässerigen Bakterienaufschwemmung Bakterien mit Hilfe einer Asbestfiltration entfernten und das Filtrat mit wässeriger Phenollösung 24 Stunden stehen ließen, so trat fast keine Phenolverminderung ein.

In 3 Flaschen wurden je 25 ccm Filtrat mit 25 ccm Phenollösung zusammengebracht. Die Phenolkonzentration zu Beginn des Versuches betrug in jeder Flasche 1,824%; nach 24 Stunden enthielt die erste 1,824%, die zweite 1,821%, die dritte 1,822%. Es wurden also nur Unterschiede von 1 bis 3 mg festgestellt, die für uns nicht in Betracht kommen. Auch eine Störung der Phenoltitration nach Koppeschar, die etwa in einer Brombindung durch die oben erwähnten Beimengungen sich hätte äußern können, findet nicht statt. Titrierten wir 35 ccm des Filtrates ohne Phenolzusatz, so wurde kein Phenolgehalt vorgetäuscht.

Die im Desinfektionsversuch zur Anwendung kommende Phenolkonzentration wurde durch Berechnung oder Kontrolltitration gefunden. Zu 20 ccm wässeriger Bakterienaufschwemmung gaben wir z. B. 25 ccm 3%ige Phenollösung; die 25 ccm enthalten 0,75 g Phenol, welche sich also im Versuch auf im ganzen 45 ccm wässerige Phenol-

bakteriensuspension verteilen. Es enthält demnach jeder Kubikzentimeter als Anfangskonzentration 0,167 g = 1,67 % Phenol. Wir setzen also hierbei die 20 ccm Bakterienaufschwemmung einen Zusatz von 20 ccm Wasser gleich. Im Laufe der Versuche wurde häufig die Anfangskonzentration des Phenols auch durch Titration bestimmt, indem wir die 25 ccm der Phenollösung mit 20 ccm Wasser an Stelle der Bakteriensuspension verdünnten und nach Koppeschar untersuchten. Wir sind uns wohl bewußt, daß wir hierbei einen kleinen Fehler machen, wenn wir Bakteriensuspension und Wasser gleichsetzen; in Wirklichkeit ist die Phenolkonzentration der wässerigen Lösung etwas größer als wir annehmen, da aber dieser Fehler wiederum zu ungunsten unserer Ergebnisse wirken muß, so können wir ihn vernachlässigen.

Zur Gewinnung der Bakterienmassenkulturen wurden Drigalskischalen mit Glyzerinagar in Oberflächenaussaat beimpft. Nach 24 Stunden wurde das Kulturmaterial von je 10 Platten mit 100 ccm Wasser abgeschwemmt. Die Abschwemmung schüttelten wir eine halbe Stunde mit Glasperlen und filtrierten durch Watte, um die gröberen Partikelchen zurückzuhalten. 20 ccm dieser Aufschwemmung wurden mit 25 ccm wässeriger Phenollösung in Glaskölbchen gebracht und mit Paraffinkork verschlossen. Die Kölbchen blieben bei Zimmertemperatur im Dunklen stehen. Für jeden Versuch wurden zwei bis drei Versuchskölbchen nebeneinander und außerdem eine Kontrolle, die statt Bakterienaufschwemmung die gleiche Menge Wasser enthielt, angestellt. Nach 24 Stunden wurden die Bakterien durch indifferente, vorbereitete Asbestfilter entfernt und mit dem klaren Filtrat die Titration ausgeführt (Tabelle I).

Tabelle I.

Versuch	I			II			III		IV	
Flaschen Nr.	I	II	III	I	II	III	I	II	I	II
Anfangskonz. der wässerigen Phenol-Bakt.-Suspension	1,229			1,217			1,201		1,185	
Phenolkonzentr. nach 24 Stunden	1,178	1,193	1,182	1,162	1,154	1,168	1,162	1,154	1,161	1,155
Unterschied	0,051	0,036	0,047	0,055	0,063	0,049	0,039	0,047	0,024	0,030

Aus der Tabelle ist ersichtlich, daß in allen Versuchen eine Abnahme der Phenolkonzentration durch die Einwirkung der Kolibazillen eingetreten ist. Wenn wir die Unterschiede in der Anfangskonzen-

tration und der Konzentration nach 24 Stunden in Prozente umrechnen, so ergeben sich 3 bis 5%.

$$1.229 : 0{,}051 = 100 : x$$

$$x = 4.1\,\%.$$

Wenn unsere Behauptung, daß die Abnahme der Phenolkonzentration in obigen Versuchen durch die Kolibazillen herbeigeführt wurde, richtig ist, so muß die Größe der Abnahme mit der Menge der einwirkenden Bakterien variieren. Dahingehende Versuche bestätigen die Richtigkeit unserer Annahme. Wir brachten 50 ccm Bakterienaufschwemmung mit 50 ccm wässeriger Phenollösung in andern Flaschen 25 ccm der gleichen Bakterienaufschwemmung in 50 ccm wässeriger Phenollösung und 25 ccm Wasser zusammen und verfuhren im übrigen wie oben. Als Bakterien fanden Kolibazillen und Staphylokokken citreus Verwendung.

Tabelle II. (Bakt. Coli).

Versuch	I			II		
Menge der Bakterien in ccm	50	25	25	50	25	25
Anfangskonzentr. der wässerigen Phenol-Bakt.-Suspension	1,854			1,857		
Konzentration des Phenols nach 24 Stunden	1,764	1,807	1,802	1,800	1,833	1,830
Unterschied	0,090	0,047	0,052	0,057	0,024	0,027
Mittelzahl	0,090	0,050		0,060	0,030	

Tabelle III. (Staphylokokken.)

Versuch	I				II		
Menge der Bakterien in ccm	50	50	25	25	50	25	25
Anfangskonz. der wässerigen Phenol-Bakt.-Suspension	2,424				2,428		
Konzentration des Phenols nach 24 Stunden	2,385	2,380	2,397	2,393	2,370	2,391	2,386
Unterschied	0,039	0,044	0,027	0,031	0,058	0,057	0,042
Mittelzahl	0,040		0,030		0,060	0,040	

Aus den beiden Tabellen ist ersichtlich, daß 50 ccm Kolisuspension eine Abnahme der Phenolkonzentration um 0,09 bedingen, während 25 ccm Kolisuspension nur 0,050 verbrauchen; unter den gleichen Versuchsbedingungen ist bei Staphylokokkenaufschwemmung durch 50 ccm Suspension eine Abnahme von 0,044, durch 25 ccm eine solche

von 0,031 zu konstatieren. Gleichzeitig ergibt sich, daß der Phenolverbrauch durch 25 ccm Bakteriensuspension relativ größer ist, als der durch 50 ccm, mit anderen Worten, daß der Phenolverbrauch durch Bakterien nicht dem Gesetz der Multipla folgt. Diese gleiche Erfahrung konnten wir übrigens schon früher gelegentlich der rein biologischen Auswertung bestimmter Phenolmengen durch steigende Bakterienmengen (cf. Mayer) machen. Es erscheint nicht ausgeschlossen, daß der Grund für dieses Verhalten der Phenolabsorptionskurve bei steigenden Bakterienmengen darin zu suchen ist, daß die in wässeriger Phenollösung durch die Bakterieneinheit gebundene Phenolmenge nicht nur von der Konzentration der Phenollösung, sondern auch von dem Verhältnis der absoluten Phenolmenge zur absoluten Bakterienmenge abhängig ist.

Wenn wir bei den einzelnen Parallelflaschen des gleichen Versuches die Phenolabnahmen untereinander vergleichen, so ergibt sich, daß dies in ziemlich weiten Grenzen, z. B. von 0,004 bis 0,015 schwanken. Für diese Schwankungen der Phenolabsorption unter gleichen Versuchsbedingungen können wir keinen bestimmten Grund angeben, es könnten verschiedene Momente ursächlich dafür in Betracht kommen: es könnten Ungleichheiten in der Dichte der angewandten Bakteriensuspension bestehen, die trotz genauer Abmessung zu verschiedenen Bakterienmengen in den einzelnen Versuchsflaschen führen müßten. Um uns über die Gleichheit der Dichte bei unseren Bakteriensuspensionen Aufklärung zu schaffen, haben wir wiederholt pyknometrische Abwägungen vorgenommen und immer fast die gleichen Zahlen gefunden.

15 ccm Koliaufschwemmung wogen bei 17° C = 21,160; 21,159; 21,160.
15 ccm „ „ „ 19° C = 21,130; 21,130;
25 ccm Milzbrandbazillenaufschwemmung wogen bei 20° C = 46,100; 46,100. Aus dem Ergebnis dieser Wägungen können wir annehmen, daß die Dichtigkeit unserer Bakteriensuspension eine praktisch gleichmäßige ist. Es könnten dann weiterhin kleine Abmessungsfehler bei der Verteilung der Bakteriensuspension auf die einzelnen Flaschen für die oben erwähnte Ungleichheit der Phenolabsorption verantwortlich gemacht werden. Folgende Überlegung zeigt, daß diese Annahme von der Hand zu weisen ist: in der ersten Flasche des Versuchs Tabelle VII beträgt die Phenolabnahme 0,051, in der zweiten Flasche 0,036. Nehmen wir an, daß die Mittelzahl aus diesen beiden Flaschen die am meisten entsprechende Abnahme der Phenolkonzentration für 25 ccm Bakterienaufschwemmung darstellt, so ergibt sich durch Berechnung, daß 1 ccm Bakteriensuspension 0,0018 Phenol ab-

sorbieren müßte. Rechne ich von dieser Zahl als Einheit auf die Anzahl der Kubikzentimeter Bakteriensuspension, welche in den beiden Flaschen vorhanden sein müßten, um die Absorption von 0,051 und 0,036 Phenol zu erklären, zurück, so müßten in der ersten Flasche statt 25 ccm Bakterienaufschwemmung 28,5 ccm und in der zweiten 20 ccm (in der dritten 26 ccm) enthalten sein. Es können also nur Abmessungsfehler für die Verschiedenheit der Phenolabsorption in Betracht kommen, die praktisch ausgeschlossen sind. Endlich könnte ein Grund für die Ungleichheit darin zu suchen sein, daß wir von den einzelnen Versuchsflaschen nicht stets die gleiche Menge keimfreies Filtrat zu Titrationszwecken herstellen. Wie oben ausgeführt, ist der störende Einfluß des Asbestfilters (auch wenn es indifferent eingestellt ist) um so geringer, je größer die absolute Menge der filtrierten Phenollösung ist. Der Filtration von Gemengen aus wässerigem Phenol und Koli- oder Staphylokokkensuspension unter Verwendung von 10 g Asbest zur Herstellung des Filters ist nun praktisch dadurch eine Grenze gesetzt, daß nur etwa 30 ccm sich klar filtrieren lassen. Nach Durchlaufen von etwa 30 ccm ist das Filter so verstopft, daß nur bei Anwendung von starkem Vakuum die Filtration noch weitergeht, und hierbei werden dann leicht Keime mit durchgesogen. Wir begnügten uns deswegen bei allen bisherigen Versuchen mit der Filtration von 25 bis 30 ccm und legten keinen Wert auf absolut gleiche Menge des Filtrates, da wir keine Fehlerquellen darin vermuteten. Bei den folgenden Versuchen, die mit Milzbrandbazillen durchgeführt wurden — die übrigens viel besser auf dem Filter zurückbleiben —, bemühten wir uns stets möglichst gleiche Mengen Filtrat zu erhalten, und tatsächlich ergaben sich in der Folge auch viel geringere Unterschiede in der Phenolabsorption der gleichen Versuchsflaschen. So z. B. sind in Tabelle X und XI nur Unterschiede von 0,002 bis höchstens 0,005 zu verzeichnen.

Die folgenden Versuche, welche mit Milzbrandbazillen angestellt wurden, sollten dazu dienen, die Kurve der Phenolabsorption bei längerer Versuchsdauer festzustellen. Das Kulturmaterial von 14 Drigalskiplatten wurde im 1. Versuch mit 200 ccm Wasser abgeschwemmt und nach kräftigem Schütteln 9 Versuchsflaschen mit je 20 ccm Bakteriensuspension beschickt; dazu gaben wir je 25 ccm der gleichen etwa 5%igen wässerigen Phenollösung. Je 3 Flaschen bildeten eine Serie und wurden nach 16, 40 und 64 Stunden auf ihren Phenolgehalt untersucht. In der Tabelle sind nun jeweils nur die Titrationszahl von 2 Flaschen angegeben, denn die 3. Flasche verwandten wir dazu, das für sich schon indifferent eingestellte Filter noch

spezifischer vorzubereiten, indem wir mit einer Phenolkonzentration durchspülten, welche der des Hauptversuches fast absolut gleichgesetzt werden darf.

Im 2. Versuch wurden 16 Drigalskiplatten mit 250 ccm Wasser abgeschwemmt, geschüttelt und durch Watte filtriert. Von dieser Bakteriensuspension wurden auf 12 Platten je 20 ccm gegeben und 25 ccm etwa 5,6% wässeriger Phenollösung zugegossen. Im übrigen wurde wie bei dem letztbeschriebenen Versuche verfahren.

Tabelle IV.

Stunden	16		24 zus. 40		24 zus. 64	
Wachstum	+		+		+	
Flaschen	I	II	III	IV	V	VI
Anfangskonzentr. der wässerigen Phenol-Bakt.-Suspension	2,510		2,510		2,510	
Konzentr. des Phenols nach der Einwirkung	2,464	2,469	2,453	2,453	2,441	2,444
Unterschied	0,046	0,041	0,057	0,057	0,069	0,066
Mittel	0,040		0,060		0,070	
Abnahme	— 0,040		0,020		0,010	

Tabelle V.

Stunden	23		25 zus. 48		20 zus. 68		24 zus. 92	
Wachstum	+		+		+		+	
Flaschen	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Anfangskonzentr. der wässerigen Phenol-Bakt.-Suspens.	2,871		2,841		2,841		2,841	
Konzentr. des Phenols nach der Einwirkung	2,785	2,780	2,770	2,766	2,763	2,763	2,766	2,764
Unterschied	0,056	0,061	0,071	0,075	0,078	0,078	0,075	0,077
Mittel	— 0,060		— 0,070		— 0,080		— 0,080	
Abnahme	— 0,060		— 0,010		— 0,010		— 0,000	

In beiden Versuchen zeigte sich, daß längere Zeit (etwa 60 Stunden) darüber vergeht, bis die Phenolabsorption durch Bakterien vollendet ist. In Versuch Tabelle IV betrug dieselbe nach 16 Stunden 0,04, nach 40 Stunden 0,06, nach 64 Stunden 0,07. Im Versuch Tabelle V nach 23 Stunden 0,06, nach 48 Stunden 0,073, nach 68 Stunden 0,078 und endlich nach 92 Stunden 0,076. Hier war

also nach 68 Stunden offenbar die Phenolabsorption auf ihrer größten Höhe angelangt, denn nach 92 Stunden ist keine weitere Zunahme, eher eine kleine Abnahme zu konstatieren. Die Wiederabnahme von 2 mg ist allerdings so klein, daß wir dieselbe in die Fehlergrenze rechnen müßten, wenn nicht weitere Versuche uns zeigten, daß tatsächlich unter ähnlichen Versuchsbedingungen die Menge des absorbierten Phenols allmählich wieder zurückgeht, so daß schließlich die wässerige Phenollösung wieder ihren anfänglichen Gehalt an Phenol aufweisen kann.

Die Reaktionsgeschwindigkeit der Phenolabsorption ist in beiden Versuchen in den ersten 24 Stunden am größten und wird im Verlauf der nächsten Stunden rasch kleiner. Sie betrug:

Versuch I, nach 16 Std. 0,04;	Versuch II, nach 16 Std. 0,06
nach weiteren 24 „ 0,02;	nach weiteren 24 „ 0,01
„ „ 24 „ 0,01;	„ „ 24 „ 0,005

In beiden Versuchen wurde eine vollständige Abtötung der Bakterien nicht erreicht, denn die Abimpfung von den einzelnen Flaschen auf Bouillon ergab noch in jedem Fall Wachstum von Milzbrandbazillen.

Durch ein weiteres Experiment (Tabelle VI) konnten wir uns überzeugen, daß das Phenol bei der Absorption durch Bakterien in seiner Struktur nicht verändert wird. Wir brachten in einer Flasche wie bisher Bakteriensuspension mit wässeriger Phenollösung zusammen und ließen 24 Stunden stehen. Nunmehr wurden 5 ccm des Inhalts entnommen und mit Wasser auf 100 ccm verdünnt. Der übrige Inhalt (Rest!) wurde durch ein indifferentes Asbestfilter filtriert und durch Titration wie bisher die Abnahme der Phenolkonzentration

Tabelle VI.

	Rest	5 ccm	Rest	5 ccm	Rest	5 ccm	Rest	5 ccm	Rest	5 ccm	Rest	5 ccm
gskonzentration des nols	1,854		1,857		1,217		2,424		2,841		2,009	
ntration d. Phenols n der Einwirkung .	1,764	1,857	1,800	1,853	1,162	1,212	2,385	2,427	2,785	2,820	1,940	1,996
schied	0,090	—	0,060	—	0,050	—	0,040	—	0,060	0,010	0,070	0,013

sichergestellt. Die auf 100 verdünnten 5 ccm der wässerigen Phenol-Bakteriensuspension wurden kräftig geschüttelt und einige Stunden darauf nach Entfernung der Bakterien der Phenolgehalt ermittelt. Es ergab sich durch Titration und Umrechnung, daß eine Phenolmenge vorhanden war, die derjenigen von 5 ccm der Bakterien-

suspension zu Beginn des Versuches fast genau entsprach. Es war demnach das von den Bakterien absorbierte Phenol durch den Zusatz von Wasser wieder frei gemacht worden und in wässerige Lösung zurückgeführt worden. Hieraus ist zu entnehmen, daß Phenol in wässeriger Lösung durch die Einwirkung von Bakterien nicht verändert, sondern nur labil an das Bakterienprotoplasma verankert wird.

In unseren ersten Versuchen, Milzbrandbazillen in wässeriger Phenollösung abzutöten, hatten wir trotz der angewandten 3%igen Konzentration des Desinfektionsmittels eine Abtötung aller Bakterien nicht erzielt. Aus verschiedenen rein praktischen Gründen war nun eine Verstärkung der Phenolwirkung in rein wässeriger Lösung ausgeschlossen: Um eine möglichst auffallende Abnahme des Phenolgehaltes zu erzielen, mußten wir recht viele Bakterien mit relativ wenig Phenol zusammenbringen. Unsere Bakterienaufschwemmungen stellten wir daher so dicht her, daß eine Abmessung der dickflüssigen Masse mit der Pipette eben noch möglich war. Um durch den Phenolzusatz nicht unnötigerweise zu verdünnen, benutzten wir höchst konzentrierte, d. h. 6%ige wässerige Phenollösung. Eine Vermehrung des absoluten Phenolgehaltes war daher ohne gleichzeitige Vermehrung des Lösungsmittels ausgeschlossen. Die Bakterienzahl durfte nicht verringert werden, weil entsprechend auch der Phenolverbrauch geringer und damit der Ausschlag undeutlich geworden wäre.

Um trotz dieser Schwierigkeiten einen Schritt weiter zu gelangen, suchten wir nach dem Vorgehen von Scheurlein die Phenolwirkung durch Kochsalzzusatz zu verstärken. Diese hatte gefunden (Handb. v. Kolle-Wassermann Bd. II, S. 31, I. Aufl.), daß eine wässerige Lösung die 1% Phenol und 24% Kochsalz enthielt, Milzbrandsporen in spätestens 3 Tagen abzutöten vermochte.

Bei unseren eigenen Versuchen wählten wir einen Zusatz von nur 7% Kochsalz, da wir befürchteten, daß eine 24%ige Kochsalzlösung für sich allein imstande wäre, den Bakterienkörper durch Plasmolyse, Wasserentziehung usw. schwer zu schädigen, event. abzutöten. Phenol wurde der Kochsalzlösung zu 2% zugesetzt. Neben den chemischen quantitativen Bestimmungen des Phenols wurden regelmäßig auch Kulturverfahren durchgeführt, um gleichzeitig über das biologische Verhalten der Bakterien Aufschluß zu bekommen. Es wurden 2 Versuche angestellt.

Versuch a, Tabelle VII.

Stunden	40				plus 24 (zus. 64)				plus 48 (zus. 112)					
Flaschen	Ia	IIa	Ib	IIb	IIIa	IVa	IIIb	IVb	Va	VIa	Vb	VIb	Ic	IIc
Wachstum in Bouillon	sehr schwach		deutlich		sehr schwach		deutlich		steril		deutlich		deutlich	
NaCl %	7%				7%				7%				0%	
ngskonzentr. der ser. Phenol-Bakt.-pension	2,009		1,102		2,009		1,102		2,009		1,102		2,009	
entr. des Phenols n der Einwirkung	1,940	1,934	1,069	1,074	1,967	1,978	1,074	1,077	1,999	1,994	1,080	1,072	1,970	1,96
rschied	0,069	0,075	0,033	0,028	0,042	0,031	0,038	0,025	0,010	0,015	0,022	0,030	0,039	0,04
dzahl	— 0,070		— 0,030		— 0,040		— 0,030		— 0,010		— 0,030		— 0,040	
hme der Konzen-ion	—		—		+ 0,030		+ 0,00		+ 0,060		+ 0,00		—	

Der Milzbrandrasen von 18 vierundzwanzigstündigen Drigalski-Schalen wurde mit 355 ccm Wasser abgeschwemmt. Hiervon dienten 2 mal je 20 ccm für salzfreie Kontrollversuche. 300 ccm wurden mit 47,25 g Kochsalz gemischt und stark geschüttelt, also in eine 15%ige Kochsalzlösung verwandelt. Von dieser salzhaltigen Bakterienaufschwemmung wurden 14 Kölbchen mit je 20 ccm beschickt und dazu 25 ccm einer 3,7%igen wässerigen Phenollösung zugegossen. Jede Flasche enthielt also in wässeriger Lösung die gleiche Menge Bakterien, Kochsalz (etwa 7%) und Phenol (etwa 2%). Ein 17. Kölbchen erhielt 20 ccm salzhaltige Bakterienaufschwemmung (wie oben) und anstatt der Phenollösung 25 ccm Wasser.

Zur biologischen Untersuchung wurden in Versuch a) nach kräftigem Durchschütteln des Inhaltes aus jeder Flasche 3 Ösen entnommen und damit einen Bouillonröhrchen beimpft; dieses wurde gut durchgemischt und daraus mit 3 Ösen ein zweites Röhrchen infiziert. Die Untersuchung auf Wachstum fand makroskopisch und mikroskopisch statt. Bei Versuch b) Tabelle VIII wurden statt der 3 Ösen je 0,1 ccm aus dem Kölbchen abgemessen, mit diesen 10 ccm Bouillon geimpft und nach gutem Durchmischen 0,1 ccm davon auf eine Agarpetrischale verarbeitet. Die Resultate sind aus den Tabellen VII und VIII ersichtlich.

Wir fanden, daß die Absorption des Phenols durch die Bakterien bei gleichen Zeiten der Einwirkung von der Konzentration des Phenols abhängig ist, denn nach Tabelle VII, Flasche Ia, IIa, Ib,

Versuch b. Tabelle VIII.

15 Platten. 250 ccm Bakterienaufschwemmung. 11 Flaschen.

Stunden	24			24 (zus. 48)			24 (zus. 72)			24 (zus. 120)				
Flaschen	Ia	IIa	Ib	IIIa	IVa	IIb	Va	VIa	IIIb	VIIa	VIIIa	IVb	Ic	IIc
Wachstum in Bouillon	—	—	stark	—	—	stark	—	—	schwach	—	—	—	schwach	schwach
NaCl %	7 %			7 %			7 %			7 %			0 %	
Anfangskonzentr. wässer. Phenol-akt.-Suspens. .	2,096		—	2,096		—	2,096		—	2,096		—	2,096	
Konzentr. d. Phe-ols nach d. Ein-wirkung . . .	2,039	2,031	—	2,043	2,046	—	2,068	2,063	—	2,103	2,095	—	2,055	2,062
Unterschied . .	0,057	0,065	—	0,053	0,050	—	0,028	0,033	—	0,007	0,001	—	0,041	0,034
Abnahme d. Kon-zentration . .	— 0,060		—	— 0,050		—	— 0,030		—	— 0,00		—	— 0,040	
Abnahme d. Kon-zentration . .	—		—	+ 0,010		—	+ 0,030		—	+ 0,060		—	—	

IIb, waren unter sonst gleichen Umständen durch die gleiche Bakterienmenge aufgenommen:

bei 2 % Phenollösung . . . . . 0,07 %
„ 1 % „ . . . . . 0,03 %

Des weiteren wird in diesen Versuchen die Absorption des Phenols durch Bakterien durch den Kochsalzzusatz verstärkt, denn in Tabelle VII, Flasche Ia, IIa, Ic, IIc und in Tabelle VIII, Flasche Ia, IIa, Ic, IIc werden resorbiert

bei 2 % Phenol ohne Kochsalz 0,04 g . . . 0,04 g
„ 2 % „ mit „ 0,07 g . . . 0,06 g

Wir vergleichen allerdings hierbei das Verhalten des Phenols in Versuchsflaschen, deren Phenolgehalt nicht nach gleichen, sondern nach verschiedenen Zeiträumen bestimmt wurde, die kochsalzfreien Proben nach 112 bzw. 120 Stunden, dagegen die kochsalzhaltigen nach 24 bzw. 40 Stunden. Diese Ungenauigkeit ist jedoch für unser Resultat ohne Belang, da wir auf Grund der ersten Versuche mit Milzbrand berechtigt sind (Tabelle IV und V), anzunehmen, daß der Unterschied in der Phenolabsorption durch Bakterien bei salzfreien Versuchen nach 24—40 Std. und nach 112 Std. ziemlich gering ist.[1])

[1]) Außerdem würde die Titration der kochsalzfreien Proben nach 24 bzw. 40 Stunden wahrscheinlich eine noch geringere Absorption als wie 0,04 ergeben haben.

Die gleichzeitig mit diesen quantitativen Bestimmungen durchgeführten biologischen Untersuchungsmethoden zur Feststellung, ob die Versuchsbakterien abgetötet oder am Leben geblieben sind, müssen in beiden Versuchen aus verschiedenen Gründen getrennt betrachtet werden. Erstens wurden bei beiden Versuchen Milzbrandbazillenstämme mit verschieden großer Widerstandsfähigkeit verwandt und außerdem wurden, wie erwähnt, verschiedene Kulturverfahren in Anwendung gebracht (vgl. Tab. VII und VIII). In Tabelle VII sind die Flaschen mit 2% Phenol und 7% Kochsalz durch Zusatz von „a" gekennzeichnet. Die entsprechenden, aus diesen Flaschen vorgenommenen Kontrollimpfungen in Bouillonröhrchen zur Feststellung der Wachstumsfähigkeit der Bazillen ergaben nach 40 und 64 Stunden ein sehr spärliches, nach 112 Stunden keinerlei Wachstum, während jeweils bei Impfung aus den Flaschen mit geringerem Phenolgehalt (b) oder ohne Phenolgehalt (c) ein üppiges Wachstum in Bouillon erzielt wurde. Da bei der Abimpfung nach 40stündiger Einwirkung der 2%igen Phenollösung in der Bouillon nach 24 Stunden nur ein sehr mäßiges Wachstum konstatiert wurde, so müssen wir annehmen, daß nur eine geringe Anzahl lebensfähiger bzw. lebensschwacher Keime eingebracht wurde. Bestärkt wird diese Annahme durch den Ausfall des Kulturversuches bei Versuch Tabelle VIII; hier konnte unter Verwendung von Bouillon und Glyzerinagarplatten nach 24stündiger Einwirkung von 2% Phenol und 7% Kochsalz kein Wachstum der Milzbrandbazillen mehr festgestellt werden. Hier könnte vielleicht der Einwand erhoben werden, daß in den Bouillonröhrchen kein Wachstum erfolgte, weil mit den 0,1 ccm Versuchsmaterial noch so viel Phenol mitübertragen wurde, daß Bakterienhemmung resultierte und daß bei der weiteren Verdünnung und Aussaat auf Agarplatten die geschwächten Milzbrandbazillen nicht so günstige Lebensbedingungen fänden wie bei Versuch VII in Bouillon. Daß hier keine Hemmungswirkung von etwa mitüberimpftem Phenol die Ursache für die Sterilität der Kulturen abgab, konnten wir durch folgenden Kontrollversuch erhärten: Wir stellten mit Nährbouillon Phenolverdünnungen mit 0,65, 0,025% und 0,01% Phenol an (bei den Überimpfungen im Hauptversuch war die Phenolkonzentration der Bouillon durch Einbringen der 0,1 ccm etwa 0,01%) und impften mit Milzbrandbazillen: nach 24stündigem Verweilen bei 37 war auf allen Röhrchen üppiges Wachstum der eingeimpften Bazillen. Eine Übertragung auf Glyzerinagarplatten ging ebenfalls gut an und man kann daher in unserem Hauptversuch auf keine Hemmungswirkung

in Bouillon und keine ungünstigen Wachstumsbedingungen für das Sterilbleiben der Kulturen verantwortlich machen.

Aus Tabelle VIII, Flasche IVb, ist zu ersehen, daß 7% Kochsalzlösung imstande ist, für sich allein Milzbrandbazillen in 120 Stunden abzutöten; bei gleichzeitigem Zusatz von 2% Phenol tritt aber die Abtötung unter sonst gleichen Umständen schon nach 24 Stunden ein. Da die Abtötungszeit so wesentlich verkürzt wird, ist man berechtigt, anzunehmen, daß beim Zusammenwirken beider Substanzen dem Phenol das Hauptabtötungsmoment zugeschrieben werden muß; das Kochsalz verstärkt nur das Bindungsvermögen der Bakterien für Phenol und beschleunigt dadurch die Desinfektionswirkung. Auch Reichel vertritt den gleichen Standpunkt, wenn er schreibt: „Die an sich bemerkenswerte Tatsache einer so hohen Resistenz von Typhusbazillen gegen immerhin stark konzentrierte Salzlösungen (10%) lehrt für unsere Beobachtung jedenfalls, daß eine direkte Schädigung der Bakterien durch Salzkonzentrationen bei Beurteilung der übrigen Versuchsergebnisse vernachlässigt werden darf.“ (S. 210.)

In dem Versuch Tabelle VIII fällt die vollständige Abtötung der Bazillen mit der größten Abnahme der Phenolkonzentration zusammen.

Tabelle VIII, Flasche Ia und IIa . . . 0,06 g

In den Flaschen, die 2% Phenol und 7% Kochsalz enthalten, beginnt dann der Phenolgehalt wieder anzusteigen, um endlich die ursprüngliche Konzentration zu Beginn des ganzen Versuches wieder zu erreichen. Wodurch diese Verstärkung der Phenolkonzentration wieder eintritt, ist schwer zu entscheiden. Wir müssen bei dem Erklärungsversuch zwei Faktoren berücksichtigen. Es wäre möglich, daß durch dauernde Kochsalzeinwirkung irgendwelche Veränderungen in den Bakterien gesetzt werden, durch welche Phenol wieder frei wird. Wäre dieses richtig, so müßten wir dieselben Resultate auch in denjenigen Versuchsflaschen erhalten, in denen ein gleich starker Kochsalzgehalt, aber 1% Phenol in Einwirkung kam. Das ist aber nicht der Fall, denn in Tabelle VII zeigen die betreffenden Flaschen nach 40 Stunden dieselbe Phenolabnahme wie nach 120 Stunden. Eine zweite Erklärung wäre in dem Tod der Bakterienzelle und damit einhergehenden physikalisch-chemischen Veränderungen der des Zelleibes zu suchen. Eine Entscheidung über diese Frage muß weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.

Auf Grund der letzten Versuche müssen wir vermuten, daß die Phenolabsorption durch Bakterien nur von der Kapazität der

lebenden Mikroorganismen abhängig ist. Mit dem Tode der Bakterien ist diese Kapazität erschöpft und die Absorption sistiert. Die Konzentration des Phenols ist nur auf die Absorptionsgeschwindigkeit von Einfluß.

Zusammenfassung.

Durch unsere Versuche über das quantitative Verhalten des Phenols bei der Einwirkung auf Bakterien gelangen sie zu folgenden Schlüssen:

Das Heimsche Asbestfilter eignet sich sehr gut zur Entfernung von Bakterien bei quantitativ-chemischen Untersuchungen.

Werden genügend große Bakterienmengen in wässerige Phenollösung gebracht, so tritt eine nachweisbare Verminderung des Phenolgehaltes der Lösung ein.

Diese Verminderung des Phenolgehaltes ist abhängig von der Menge der Bakterien, der Zeit der Einwirkung, von der absoluten Menge und der Konzentration des Phenols.

Das Phenol wird durch Bakterieneinwirkung nicht zerstört, sondern an das Bakterienprotoplasma labil gebunden (verankert).

Die Kurve der Phenolabsorption durch Milzbrandbazillen steigt steil an und gelangt dann in sehr flachem Bogen zu ihrem Höhepunkt.

Durch Kochsalzzusatz wird unter sonst gleichen Versuchsbedingungen die Phenolabsorption durch Bakterien beträchtlich verstärkt.

Die Absorptionskurve bei Phenol-Kochsalz-Versuchen sinkt zurück, wenn die Hauptmasse der Bakterien abgetötet ist und erreicht fast wieder den Nullpunkt.

Literatur.

1. Koch, Robert, „Über Desinfektion“, Mitteil. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamte 1881, Bd. 1, S. 234.
2. Wolffhügel und Knorre, „Zu der verschiedenen Wirksamkeit von Karbolöl und Karbolwasser“, ebenda.
3. Scheurlen, „Die Bedeutung des Molekularzustandes der wassergelösten Desinfektionsmittel für ihre Wirkungswerte“, Arch. f. experim. Pathol. und Pharmac. 1896, Bd. 37, S. 74.
4. Scheurlen und Spiro, „Die gesetzmäßigen Beziehungen zwischen Lösungszustand und Wirkungswert der Desinfektionsmittel“, Münchn. med. Wochenschrift 1897, Bd. 44, S. 4.
5. Spiro und Bruns, „Zur Theorie der Desinfektion“, Arch. f. experim. Pathol. und Pharmac. 1898, Bd. 41, S. 355.
6. Reichel, „Zur Theorie der Desinfektion“, Bioch. Zeitschr. 1909, Bd. 22, S. 149.
7. Herzog u. Betzel, Zur Theorie der Desinfektion. Zeitschr. f. physiolog. Chemie 1912.

Lebenslauf.

Ich, Leonard Bojakowski, katholischer Konfession, wurde im Jahre 1887 in Warschau (Russ. Polen) geboren. Ich besuchte das III. Gymnasium in Warschau, mußte dasselbe aus Gesundheitsrücksichten im Jahre 1903 verlassen und erwarb mir später im Juli 1906 am Gymnasium zu St. Petersburg das Reifezeugnis. Mein Universitätsstudium (Medizin) begann ich an der Universität Krakau (Galizien) und verblieb dort 2 Semester. Dann studierte ich 5 Semester an der Universität München und verbrachte die 3 letzten Studiensemester an der Universität Freiburg i. Br. Hier beendigte ich am 11. Mai 1912 das medizinische Doktorexamen für Ausländer.